

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



Tereza Šamšulová

**Sladkovodní zelené řasy v polárních oblastech:
diverzita, biogeografie a porovnání metod studia**

Freshwater green algae in polar regions:
diversity, biogeography and methodology comparison

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Linda Nedbalová, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 16. 8. 2018

Podpis:

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Lindě Nedbalové, Ph.D. za veškerý čas, který mi věnovala při přípravě bakalářské práce, za cenné rady a zkušenosti a za možnost účastnit se terénního výzkumu, konference a práce v laboratoři.

Abstrakt

Zelené řasy (Chlorophyta) jsou v polárních oblastech důležitou skupinou primárních producentů, ale dosud jim byla ve srovnání se sinicemi a rozsivkami věnována menší pozornost. Podmínky prostředí ve sladkovodních habitatech Arktidy a Antarktidy (jezera, mokřady, potoky a řeky, ledovce a sněhová pole) jsou velmi variabilní a mikroorganismy zde musí odolávat řadě extrémních podmínek. Přehled 58 rodů zelených řas z polárních oblastí ukázal převahu zástupců z tříd Chlorophyceae a Trebouxiophyceae, více rodů bylo doloženo z Arktidy. Z hlediska typu habitatu jsou rodově nejbohatší jezera a nejméně bohaté mokřady. To může být ale ovlivněno nevyrovnaným počtem prací z obou polárních oblastí a z různých habitatů. Výskyt několika druhů byl dosud doložen pouze z Antarktidy, celkově se ale rozšíření zelených řas předpokládá spíše kosmopolitní. Tradiční metodou výzkumu biodiverzity je světelná mikroskopie, která má však omezení kvůli většinou jednoduché morfologii zelených řas. Jejich určení do rodu či druhu je proto často možné až pomocí molekulárních metod. Zatímco sekvenování Sangerovou metodou je využíváno pro charakterizaci jednodruhových izolátů, metagenomová analýza umožňuje podchycení nekultivovatelných či vzácných druhů. Optimální strategií pro hodnocení biodiverzity této skupiny je využití kombinace více metod zahrnující i ekofyziologickou charakterizaci kmenů.

Klíčová slova:

Chlorophyta, zelené řasy, Arktida, Antarktida, biogeografie, mikroskopie, Sanger, NGS, metagenomová analýza

Abstract

Green algae (Chlorophyta) are an important group of primary producers in polar regions, but they received less attention in comparison with cyanobacteria and diatoms. Environmental conditions of freshwater habitats in the Arctic and Antarctica (lakes, wetlands, streams, glaciers and snow) are very variable and microorganisms have to resist multiple extreme conditions. The overview of 58 green algal genera from polar regions showed the prevalence of representatives from the Chlorophyceae and Trebouxiophyceae, more genera were documented from the Arctic. Lakes have the highest and wetlands the lowest genus richness. This fact could be affected by uneven number of studies in both polar regions and from different habitats. The occurrence of several species has been documented only in Antarctica, but overall the green algae distribution is supposed to be rather ubiquitous. The traditional method of biodiversity research is light microscopy, which has limitations due to simple morphology of green algae. Their identification at genus or species level is thus often possible only using molecular methods. While sequencing by Sanger method is used for determination of monospecific isolates, metagenome analysis allows the identification of non-cultivable or rare species. The use of combination of methods including the ecophysiological characterization of strains represents the optimal strategy for biodiversity assessment of this group.

Keywords:

Chlorophyta, green algae, Arctic, Antarctica, biogeography, microscopy, Sanger, NGS, metagenome analysis

Obsah

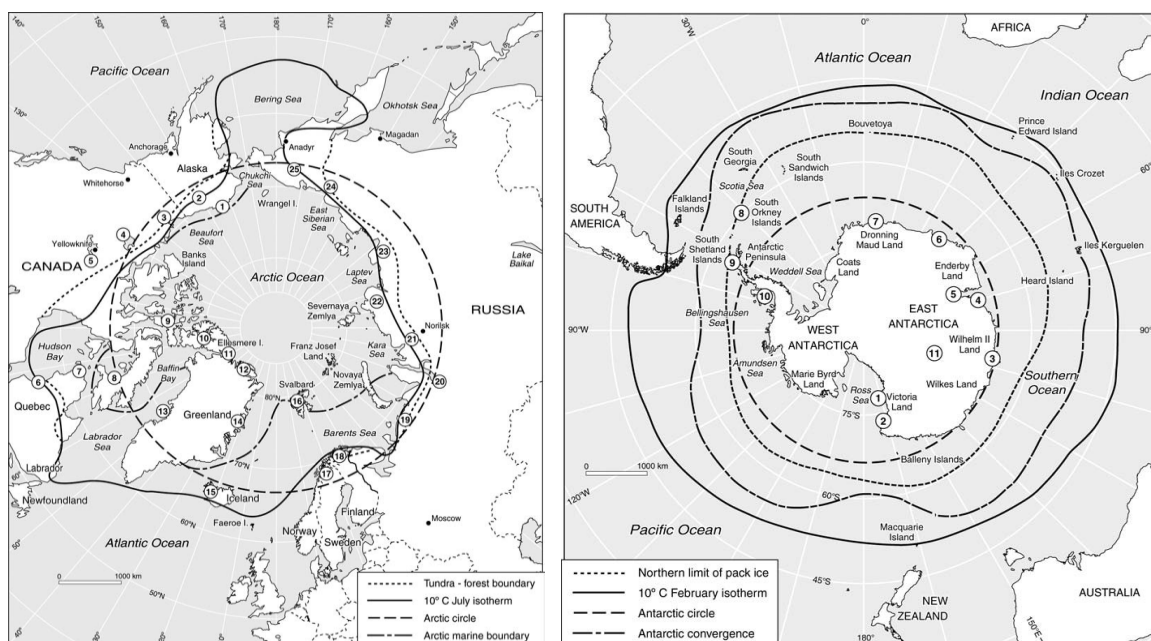
1	Úvod.....	1
2	Sladkovodní habitaty polárních oblastí.....	3
2.1	Jezera	4
2.2	Mokřady.....	5
2.3	Řeky a potoky	5
2.4	Ledovce a sníh	6
3	Sladkovodní zelené řasy v polárních oblastech	7
4	Biogeografie.....	12
5	Metody studia diverzity	16
5.1	Světelná mikroskopie	17
5.2	Elektronová mikroskopie.....	18
5.2.1	Skenovací elektronová mikroskopie	18
5.2.2	Transmisní elektronová mikroskopie	18
5.3	Izolační techniky a kultivace	19
5.4	Molekulární metody studia diverzity.....	20
5.4.1	Porovnání Sangerovy metody a metagenomové analýzy.....	21
5.4.2	Geny využívané pro fylogenetické studium zelených řas	22
5.4.3	Využití polyfázického přístupu pro studium diverzity zelených řas v polárních oblastech	23
6	Závěr	25
7	Literární zdroje.....	26

1 Úvod

Z ekologického hlediska mají v polárních oblastech výsadní postavení fotoautotrofní mikroorganismy, které zde představují dominantní primární producenty přítomné ve všech typech prostředí (Elster & Benson, 2004). Ve sladkovodních habitatech polárních oblastí jsou spolu se sinicemi a rozsivkami důležitou skupinou zelené řasy (Chlorophyta). Vyskytují se v jezerech, řekách a potocích, mokřadech, na ledovcích a sněhu. Musí se přitom vyrovnávat s extrémními podmínkami jako jsou nízké teploty, zamrzání a vysychání, nízká i vysoká intenzita záření a často s nízkými koncentracemi živin. Oproti temperátním oblastem a jiným taxonomickým skupinám je polárním zeleným řasám věnována výrazně menší pozornost, ačkoliv hrají významnou roli v tamních ekosystémech a mohly by ovlivnit dokonce i průběh globální změny klimatu (Kvíděrová et al., 2017; Lutz et al., 2017).

Polární oblasti nemají jednoznačné vymezení. Na jižním pólu se zpravidla jedná o antarktický kontinent s okolním Jižním oceánem odděleným zónou konvergence, v Arktidě není toto vymezení tak jednoduché kvůli oceánským proudům, které oteplují některé části Arktidy (Obr. 1). Geograficky se tyto oblasti vymezují polárním kruhem, tedy za 66°33' severní a jižní rovnoběžkou, ale z biologického hlediska je vhodnější klimatické vymezení. Podle něj se za polární oblast označuje místo, kde v nejteplejším měsíci v roce nepřekročí průměrná teplota 10 °C (Obr. 1, Vincent & Laybourn-Parry (2008)). Celkově pokrývají polární oblasti značnou část naší planety, a tvoří tedy největší areály s extrémními podmínkami. Z klimatického hlediska se jedná v současné době o nejrychleji se měnící oblasti na Zemi (Peck et al., 2005).

Arktické a antarktické sladkovodní habitaty poskytují různé typy prostředí pro život organismů. V kombinaci s odlišnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi představují komplexní a přitom jednodušší systém, než je tomu v jiných oblastech Země. Jsou proto nesmírně cenné a umožňují lepší pochopení veškerých sladkovodních habitatů, zejména v oboru ekologie či mikrobiologie. V Arktidě i Antarktidě jsou typické nízké teploty, přítomný efekt sněhu a ledu, malý přísun slunečního záření během roku a extrémní sezonalita ve světelném a teplotním režimu. Antarktida je izolovaný kontinent, zatímco Arktida představuje povětšinou severní výběžky kontinentů (Severní Amerika, Asie, Evropa), což má vliv na klima, kolonizování organismy a tedy i biogeografii (Elster & Benson, 2004; Vincent & Laybourn-Parry, 2008).



Obr. 1: Vymezení polárních oblastí: Arktida (vlevo) a Antarktida (vpravo). Plnou čarou je znázorněna 10°C izoterma nejteplejšího měsíce. Čísla označují významné jezerní oblasti (Vincent & Laybourn-Parry, 2008).

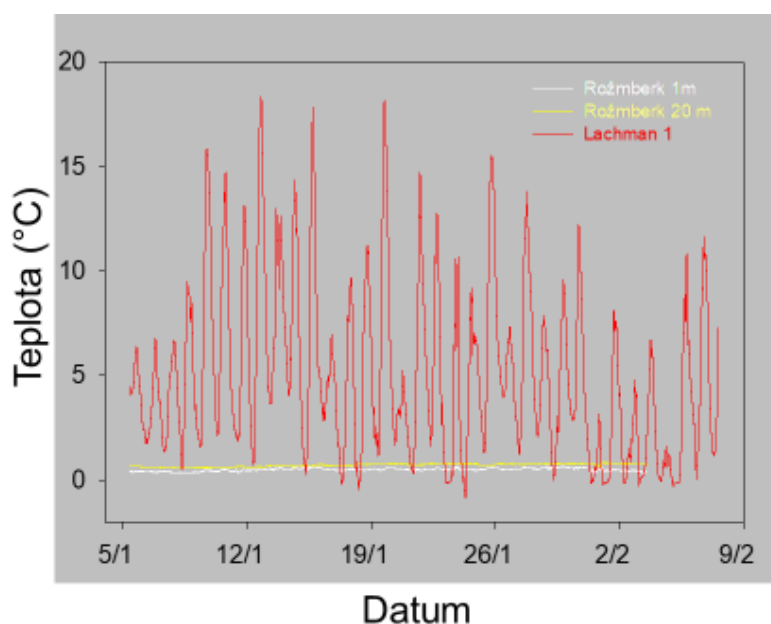
Díky mnohem větší izolaci ve srovnání s Arktidou se předpokládá větší míra endemismu v Antarktidě, což bylo prokázáno například pro některé skupiny sladkovodních bezobratlých (Convey & Stevens, 2007). Názory na situaci ve skupině zelených řas se liší (Broady, 1996; De Wever et al., 2009).

Diverzita zelených řas je studována širokou škálou metod. Mezi ně se řadí přístupy morfologické, jako je světelná a elektronová mikroskopie, a molekulární, tedy různé metody zkoumání genetické informace organismů. Jejich vývoj je zvláště v posledních desetiletích značně dramatický od nástupu sekvenování DNA pomocí Sangerovy metody (Sanger et al., 1977). Metagenomové analýzy dnes umožňují relativně rychle získat obrovské množství dat, avšak následné zpracování dat ze sekvenátorů nové generace vyžaduje značné bioinformatické znalosti. Práci aplikujících tyto metody na skupinu zelených řas je však zatím poměrně málo (De Wever et al., 2009; Rippin et al., 2018).

Hlavním cílem práce je shrnout známá data o diverzitě zelených řas ve sladkovodních habitatech v Arktidě a Antarktidě včetně zhodnocení dosud známých informací o míře endemismu této skupiny v těchto oblastech. Důležitou součástí práce je také přehled metod vhodných ke studiu jejich biodiverzity.

2 Sladkovodní habitaty polárních oblastí

Jezera, mokřady a tekoucí vody jsou výrazným rysem arktické krajiny a jsou také běžné v mnoha oblastech Antarktidy, zejména v blízkosti mořského pobřeží. Kapalnou vodu umožňující rozvoj fotoautotrofních mikroorganismů najdeme poměrně často také na povrchu ledovců a sněhových polí. Sladkovodní habitaty v polárních oblastech jsou prostředí s velkou variabilitou podmínek. Obecně je charakterizuje nízká teplota a s výjimkou hlubokých jezer často vysoká intenzita slunečního záření během krátké vegetační sezóny. Dostupnost kapalné vody je regulována sezónními cykly zamrzání a tání, které v některých typech prostředí omezují biologickou aktivitu na období dnů až několika málo týdnů ročně (Vincent & Laybourn-Parry, 2008). S ohledem na charakteristické teplotní režimy můžeme polární habitaty rozdělit na stabilní, jako jsou například sněhová pole a ledovce a nestabilní, jako jsou mělké mokřady a jezera. Zatímco ve stabilních typech prostředí se často vyskytují specializované psychrofilní organismy, v nestabilních najdeme spíše generalisty (psychrotrofní organismy), jejichž teplotní optimum růstu je vyšší než 15 °C (Elster & Benson, 2004).



Obr. 2: Srovnání průběhu teploty vody v hlubokém (Rožmberk) a mělkém (Lachman) jezeře na ostrově Jamese Rosse v maritimní Antarktidě v letním období (upraveno podle Nedbalová et al., 2013).

2.1 Jezera

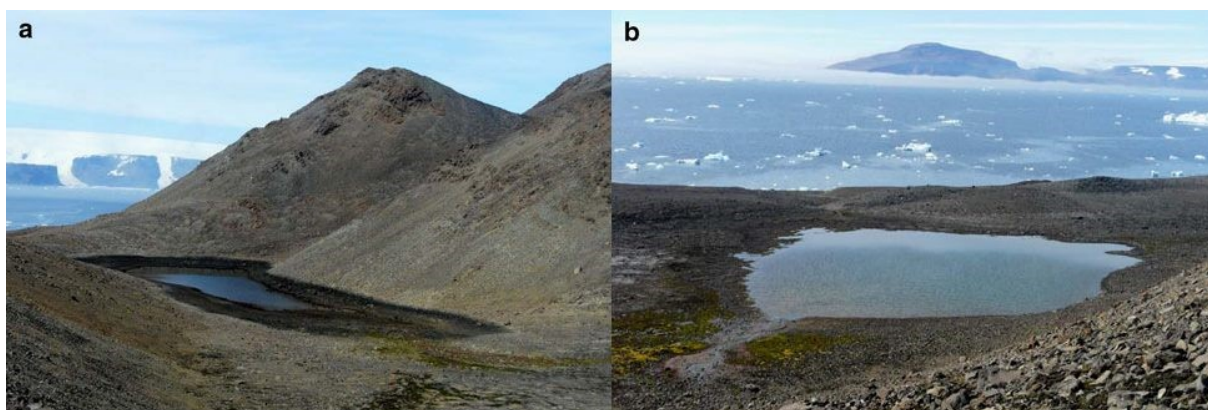
V polárních oblastech se vyskytuje velké množství typů jezer lišících se způsobem vzniku, stářím, vzdáleností od pobřeží a nadmořskou výškou. Tyto faktory ovlivňují teplotní režim, fyzikálně chemické podmínky a v důsledku i charakter společenstev. Najdeme zde jezera sladkovodní i hypersalinní, kyselá i alkalická, jezera trvale zamrzlá i taková, která díky vysoké salinitě nikdy nezamrzají. Například za 70° rovnoběžkou j. š. jsou v Antarktidě trvale zamrzlá jezera s ledovou pokrývkou o mocnosti zhruba 5 m, jejímž důsledkem je extrémní snížení světelné intenzity, stálá teplota vody a absence míchání. Vznik většiny jezer v polárních oblastech je spojen s činností ledovců a s jejich ústupem po poslední době ledové, podstatně vzácnější jsou jezera tektonická nebo sopečná. Některé typy jezer jsou vázány pouze na polární oblasti, mezi ně patří zejména jezera epišelfová či subglaciální (Vincent & Laybourn-Parry, 2008).

Velké množství jezer vzniklo v souvislosti s růstem teploty v nedávném období. Například oblast Antarktického poloostrova je aktuálně považována za jednu z nejrychleji se oteplujících na Zemi (Turner et al., 2005). Současné oteplování má ale v oblasti Arktidy za následek opačný efekt, tj. je zde pozorováno významné zmenšení celkové plochy jezer v rozsáhlých oblastech a ke zkrácení doby jejich zámruzu (Smith et al., 2005).

Mezi běžné typy mladých jezer v Arktidě i v Antarktidě patří jezera termokrasová a zahloubená („kettle lakes“). Vznikají po roztátí permafrostu či ledové výplně morén a zaplnění prohlubní vodou. Jezera proglaciální přímo souvisejí s ledovcem. Tato jezera jsou nejmladší, jejich trvání je většinou omezeno na krátkou dobu (několik desetiletí) a proto je možné je považovat za velmi dynamické systémy. Dalším významným typem jsou jezera na mořských terasách, která vznikají zaplavením a následným poklesem mořské hladiny při ústupu ledovců. Jsou to jezera se až několik tisíc let stará, jsou většinou mělká, proto se v letních měsících rychle prohřívají. Kvůli malé hloubce těchto dvou typů jezer jsou teplotně variabilní s velkými výkyvy teplot během celého roku, ale i kratší doby (Obr. 2, 3). Zejména kvůli časté přítomnosti ptáků jsou obvykle bohatší na živiny. Ve vyšších nadmořských výškách se vyskytují karová jezera. Bývají hlubší a rozlohou větší, a proto jsou jen po krátkou část roku bez ledové pokrývky. Vznikají v místech původní akumulace ledovce, poté v místech nahromadění sněhu (Pienitz et al., 2008).

Díky dlouhodobé přítomnosti vody v kapalném skupenství jsou polární jezera považována za důležitá centra biodiverzity, která hostí cenná společenstva, často s podílem endemických druhů (Laybourn-Parry & Pearce, 2007). Struktura potravních řetězců v jezerech je většinou velmi jednoduchá; v Arktidě je komplexnější než v Antarktidě díky větší diverzitě

zooplanktonu a přítomnosti ryb. V nejvíce extrémních podmínkách trvale zamrzlých jezer (např. v oblasti Mc Murdo Dry Valleys) dokonce chybí planktonní korýši (Vincent & Laybourn-Parry, 2008).



Obr. 3: Mělká jezera na ostrově Jamese Rosse, Antarktida (Škaloud et al., 2013).

2.2 Mokřady

Mokřady (někdy označované termínem „seepages“) se obecně hojněji vyskytují v Arktidě, kvůli vyšším srážkám v nižších zeměpisných šířkách jsou mokřady častější v nízké Arktidě než ve vysoké. Jejich velikost může být od malých pásů po rozsáhlé plochy. Sluneční záření absorbované zemským povrchem je téměř všechno transformováno na letní tání. Hlavním zdrojem vody pro mokřady jsou ledovce a sněhová pole. Důležitou roli pro jejich tvorbu hraje permafrost, který je v malé hloubce pod povrchem a vytváří bariéru v podobě zmrzlé země a brání tak odtoku povrchové vody, která zůstává v tekutém stavu téměř po celou dobu polárního léta. Na rozdíl od většiny jezer v zimní sezóně celé promrzají. Tento fakt mokřady charakterizuje a má značný vliv na místní organismy (Elster & Benson, 2004). Tzv. seepages představují unikátní prostředí v odledněných oblastech maritimní Antarktidy, zastoupení druhů a složení společenstva je specifické a liší se od jiných mokřadních habitatů.

2.3 Řeky a potoky

Řeky a potoky jsou důležité a dynamické ekosystémy a jejich ekologie odráží, jak extrémní podmínky jsou v krajině vysokých zeměpisných šířek. Velmi chladná voda v nich pochází většinou z tajících ledovců a řeky jsou poměrně krátké. Jsou chudé na živiny, nicméně mohou být během léta obohaceny velkými populacemi ptáků. Kvůli často silnému proudu v řekách a potocích dochází k silným mechanickým disturbancím, a proto jsou zde nárosty sinic

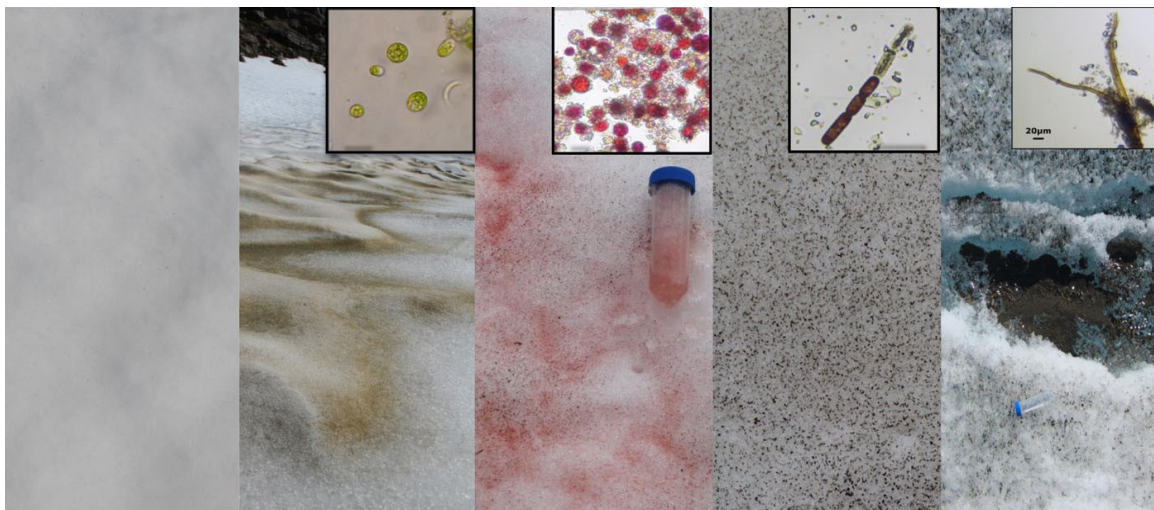
a řas podstatně méně bohaté než v mokřadních ekosystémech (Hawes, 1989). V Antarktidě, kde odledněné plochy nejsou tak rozsáhlé jako v Arktidě, můžeme nalézt jen potoky s průtokem omezeným pouze na několik týdnů v roce. Nicméně zvýšením průtoku mohou tyto toky přinášet do jezer a údolí poměrně velké množství živin. Naproti tomu v Arktidě existuje velká diverzita řek a potoků, od malých jarních potůčků po velké řeky, které představují významný přísun sladké vody do Severního ledového oceánu (Hawes & Brazier, 1991; Hawes, 1989; McKnight et al., 2008).

2.4 Ledovce a sníh

Významným habitatem v polárních oblastech jsou i ledovce a sníh. Tající sníh se vyskytuje nejen na povrchu ledovců, ale i na samostatně se vyskytujících sněhových polích. Organismy žijící na těchto místech musí odolávat extrémním podmínkám jako je vysoká intenzita slunečního záření a obvykle velmi nízké koncentrace živin (Nedbalová & Komárek, 2007).

Na sněhových polích, která mohou přetrvávat po celý rok, se vyskytují sněžné řasy. Ty mohou žít jak na povrchu nebo hlouběji ve sněhu, aby se ochránily před vysokou intenzitou slunečního záření. Zbarvují sníh do červené, žluté, zelené či šedé barvy vlivem jejich masivního růstu a tzv. barevné sněhy jsou význačným fenoménem polárních oblastí. Vyskytují se na místech, kde teplota na sněhu překračuje periodicky 0°C, s čímž je spojený vysoký vodní obsah sněhu (Vincent, 1988; Nedbalová & Komárek, 2007).

Na povrchu ledovců najdeme zvláštní typ sladkovodních habitatů, který je spojen s přítomností kryokonitu. Organický a anorganický materiál přinášený větrem z okolí kvůli nižšímu albedu absorbuje více slunečního záření, ohřívá se a protává do ledovce a vytváří se tzv. kryokonitová jamka vyplněná vodou. Tento mikrohabitat umožňuje život řasám, sinicím a některým bezobratlým živočichům díky přítomnosti kapalné vody a relativně vyššímu obsahu živin (Hodson et al., 2008; Edwards et al., 2011). Pestrůst organismů vyskytujících se na povrchu ledovců ukazuje Obr. 4.



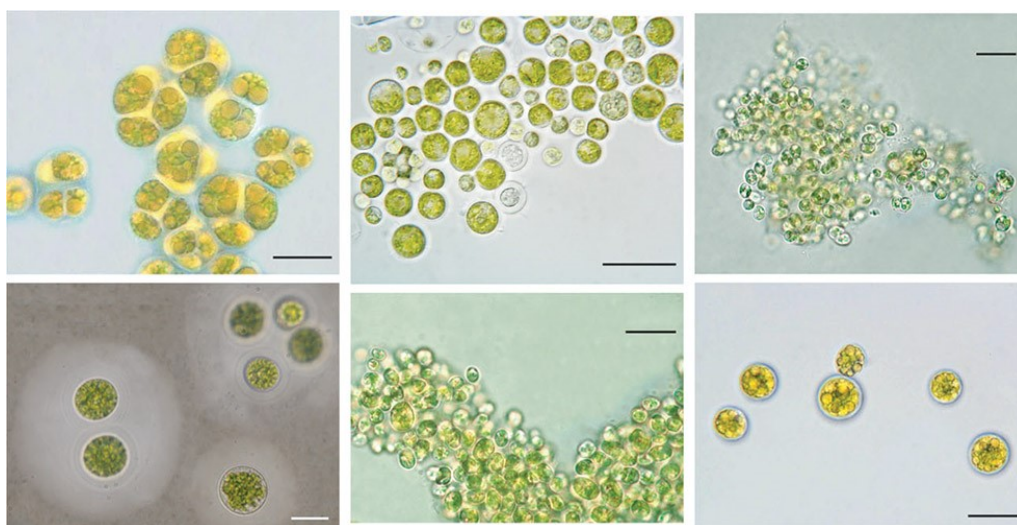
Obr. 4: Ukázka fotoautotrofních organismů vyskytujících se na povrchu ledovců. Zleva: bílý sníh na začátku sezóny, zelený a červený sníh s dominantní řasou z rodu *Chlamydomonas*, „špinavý“ sníh s primárním producentem ze skupiny Zygnematales (*Ancylonema nordenskiöldii*) a kryokonitová jamka s jedním z primárních producentů, sinicí *Phormidesmis priestleyi*. Upraveno podle Anesio et al. (2017).

3 Sladkovodní zelené řasy v polárních oblastech

Zelené řasy (Chlorophyta) jsou důležitou skupinou primárních producentů nejen v polárních oblastech. Je to stará a taxonomicky diverzifikovaná skupina s asi 8 000 druhů a předpokládá se, že je jich ještě zhruba 5 000 nepopsaných (Guiry, 2012). V této práci je diskutováno široké pojetí zelených řas, tedy včetně streptofytní linie. Zelené řasy jsou charakterizovány přítomností chloroplastů se dvěma membránami a thylakoidy. Barviva zelených řas jsou chlorofyl a, b, karoteny a xantofyly. V chloroplastu jsou uloženy pyrenoidy a jsou obklopeny škrobovými zrny, která jsou hlavní zásobní látkou polysacharidů (Brodie & Lewis, 2007). Zástupci skupiny Chlorophyta jsou často využíváni jako bioindikátory ve vodách a díky jejich rychlému růstu jsou zajímaví pro biotechnologické aplikace, jako je produkce biopaliv, potravinových doplňků či třeba kosmetických přípravků (Kvíděrová et al., 2017). Většina zelených řas má velmi pevnou buněčnou stěnu a celkově jsou to velice odolné organismy, které jsou schopné vytvářet tzv. trvalá stádia a odolávat stresu, jako je v polárních oblastech např. vymrzání či vysychání (Hawes, 1988; Remias et al., 2013). Oproti sinicím je pro ně typický rychlejší růst v období letní sezóny (Vincent & Laybourn-Parry, 2008). Skupina zelených řas je jedna z nejdiversifikovanějších skupin eukaryot vyskytující se celosvětově jak ve sladkých vodách, tak i v mořích a půdách, od aridních, temperátních až po polární oblasti. Vykazují velkou morfologickou variabilitu, nicméně zástupci vyskytující se v polárních

oblastech jsou většinou jednobuněční bičíkovci či kokální řasy (Obr. 5, Brodie & Lewis, 2007). V polárních oblastech se vyskytují ve všech typech sladkovodních habitatů, kde je dostupné fotosynteticky aktivní záření, tj. v jezerech, potocích, řekách, mokřadech a na povrchu ledovců či sněhových polí (Vincent & Laybourn-Parry, 2008; Becker & Marin, 2009; Subhadra & Grinson-George, 2011; Amengual-Morro et al., 2012; Guiry, 2012; Leliaert et al., 2012; Hadi et al., 2016).

Přehled sladkovodních zelených řas uvedený v Tabulce 1 zahrnuje 58 rodů z osmi tříd, které byly zjištěny v polárních oblastech. Nejvíce zastoupené byly třídy Chlorophyceae a Trebouxiophyceae. Z dostupné literatury v databázi Web of Science byl počet nalezených rodů zelených řas vyšší v Arktidě než v Antarktidě. Nejvíce rodů bylo nalezeno v jezerech (44 rodů), v řekách a potocích to 17 rodů, na ledovcích a sněhu 16 rodů a nejméně rodů bylo nalezeno v mokřadních habitatech (7). Vzhledem k tomu, že je zatím relativně málo studií o zelených řasách v polárních oblastech, budou tyto počty pravděpodobně vyšší.



Obr. 5: Mikrofotografie antarktických kmenů zelených řas vyizolovaných ze sedimentu jezer. Upraveno podle De Wever et al. (2009).

V polárních jezerech najdeme zelené řasy jak v planktonu, tak v bentosu. Tato skupina je v obou typech prostředí málokdy dominantní, výjimkou jsou například zástupci rodů *Ankistrodesmus* a *Monoraphidium* v planktonu některých antarktických jezerech (Butler et al., 2000; Nedbalová et al., 2017) nebo vláknitá řasa *Hazenia broadyi* tvořící nápadné povlaky v litorálu (Škaloud et al., 2013). Velmi specifickým prostředím se vyznačují trvale zamrzlá jezera, kde musí organismy dokázat přežít při velmi nízké intenzitě záření. Zelené řasy

se dokáží adaptovat na nejrůznější podmínky, jak experimentálně dokázali Morgan-Kiss et al. (2005), kteří studovali psychrofilní planktonní řasu *Chlamydomonas raudensis* popsanou z trvale zamrzlého jezera Bonney v Antarktidě. Díky extrémním podmínkám ve svém původním habitatu tato řasa neroste pod červeným spektrem světla, ale je schopná limitované adaptace při postupném posunu vlnových délek.

V mokřadních habitatech, které jsou zásobovány hlavně vodou z tajících ledovců a sněhových polí se vyskytují zelené řasy, pro které je největší stresový faktor během letní sezóny vysychání, během jara a podzimu střídání mrznutí a tání a v zimě úplné zamrznutí. Organismy zde žijící musí proto být dobře adaptováni na tyto nepříznivé podmínky a musí být na jaře schopni velmi rychlého růstu. Typickým zástupcem zelených řas vyskytující se v těchto habitatech je *Zygnema*, která má velmi odolné spory (Pichrtová et al., 2016).

Zelené řasy vyskytující se v potocích a řekách Arktidy a Antarktidy žijí ve velmi chladné vodě pocházející převážně z tajících ledovců a musí být schopné odolávat velkým disturbancím. Například podle Hawes & Brazier (1991) existuje závislost množství nárostů zelených řas na pevnosti substrátu. Na rozdíl od jezer jsou v tekoucích vodách zelené řasy často dominantními primárními producenty. Nejčastějšími rody uváděnými z těchto habitatů jsou *Prasiola* (Mataloni et al., 2005) nebo *Klebsormidium* (Hawes & Brazier, 1991).

Sněžné řasy způsobující barevné sněhy patří mezi psychrofilní organismy. Jejich populace tvořené především zástupci rodů *Chlamydomonas* a *Chloromonas* patří mezi nejnápadnější mikroorganismy vyskytující se v chladných habitatech. Jejich komplexní životní cyklus zahrnuje vegetativní pohyblivé buňky s bičíkem a klidové („resting“) buňky, které se pasivně pohybují během tání (Nedbalová & Komárek, 2007). Typickým zástupcem vyskytujícím se na sněhových polích je *Chlamydomonas nivalis*, která je původcem tzv. červeného sněhu známého z polárních i vysokohorských oblastí celého světa (Segawa et al., 2018). Na povrchu ledovců se často vyskytují kromě sněžných řas také zástupci třídy Zygnematophyceae z rodů *Ancylonema*, *Cylindrocystis* nebo *Mesotaenium* které také mohou tvořit vegetační zabarvení (Remias et al., 2009).

Tabulka 1: Přehled rodů zelených řas vyskytujících se ve sladkovodních habitatech polárních oblastí, kde je znázorněn výskyt (x) a absence nebo zatím neprokázaný výskyt (-).

	Habitat:				Zdroj:
Třída/Rod	Jezera	Mokřady	Řeky, potoky	Ledovce, sníh	
Pedinophyceae					
Pedinomonas	x	-	-	-	22.
Prasinophyceae					
Monomastix	x	-	-	-	22.
Pyramimonas	x	-	-	-	8.
Chlorophyceae					
Ankistrodesmus	x	-	-	-	22.
Ankyra	x	-	-	-	22.
Bracteacoccus	-	-	-	x	21.
Carteria	x	-	-	-	5.
Coelastrella	x	-	-	-	1.
Coleochlamys	-	x	-	x	21., 24.
Cylindromonas	-	-	-	x	16.
Desmotetra	-	-	-	x	7., 9.
Dunaliella	x	-	-	-	1.
Gloeococcus	x	-	-	-	1.
Haematococcus	x	-	-	-	7.
Chlamydomonas	x	x	x	x	1., 4., 10., 16., 20., 25., 26.
Chlorococcum	x	x	x	x	1., 9., 21., 27.
Chlorogonium	x	-	-	-	5.
Chloromonas	x	-	x	x	1., 9., 10.
Chodatodesmus	x	-	-	-	17.
Microspora	-	-	x	-	18.
Monoraphidium	x	-	x	-	5., 9., 11.
Oedogonium	x	-	-	-	22.
Pediastrum	x	-	-	-	22.
Scenedesmus	x	-	-	-	1.
Tetraspora	x	-	x	-	15.
Trebouxiophyceae					
Botryococcus	x	-	-	-	22.
Gloeotila	x	-	-	-	22.
Chlorella	x	-	-	x	1., 16., 23.
Koliella	-	-	x	-	10.
Micractinium	-	-	x	-	9.
Muriella	-	-	-	x	21.
Nannochloris	x	-	-	-	1.
Oocystis	x	-	-	-	22.
Paradoxia	x	-	-	-	1.
Prasiola	x	x	x	-	5., 9., 28.
Pseudococcomyxa	-	-	-	x	21.

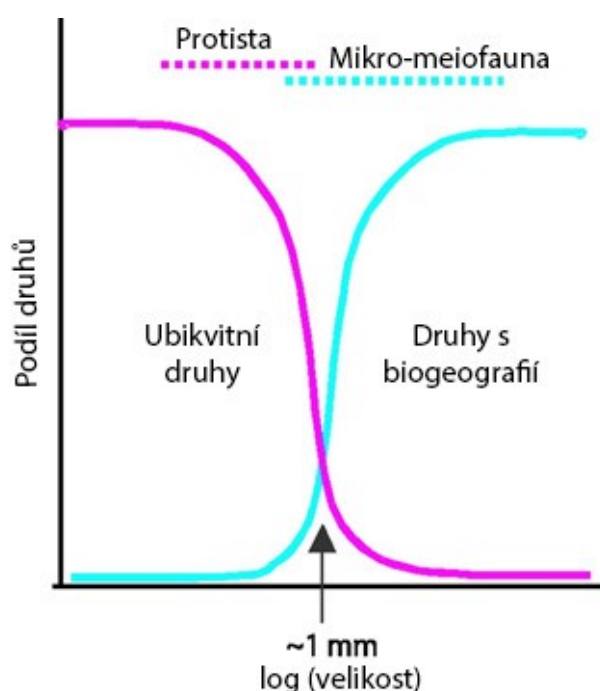
Tabulka 1: pokračování

	Habitat:				Zdroj:
Třída/Rod	Jezera	Mokřady	Řeky, potoky	Ledovce, sníh	
Trebouxiphyceae (pokračování)					
Raphidonema	x	-	x	x	1., 5., 9., 10., 22.
Scotiella	-	-	-	x	21.
Stichococcus	x	-	x	x	10., 21., 23., 29., 30.
Trebouxia	x	-	-	-	1.
Ulvophyceae					
Binuclearia	x	-	-	-	22.
Cladophora	x	-	x	-	7., 31.
Hazenia	x	-	-	-	19.
Rhizoclonium	-	-	x	-	18.
Ulothrix	x	-	-	-	5., 12.
Zygnematophyceae					
Ancylonema	-	-	-	x	32.
Closterium	x	-	-	-	22.
Cosmarium	x	x	-	-	10., 22.
Cylindrocystis	x	-	-	-	5.
Euastrum	x	-	-	-	22.
Mesotaenium	-	-	-	x	32.
Micrasterias	x	-	-	-	13.
Mougeotia	x	-	x	-	3., 22.
Spirogyra	x	-	x	-	2.
Staurastrum	x	-	-	-	12.
Zygnema	x	x	x	-	14.
Charophyceae					
Nitella	x	-	-	-	6.
Klebsormidiophyceae					
Klebsormidium	-	x	x	x	7., 24.

Zdroje k tabulce 1: 1. (De Wever et al., 2009); 2. (Hawes, 1988); 3. (Hawes, 1989); 4. (Izaguirre et al., 2001); 5. (Izaguirre et al., 2015); 6. (Jónasson, 1992); 7. (Kim et al., 2008); 8. (Säwström et al., 2002); 9. (Mataloni et al., 2005); 10. (Müller et al., 1998); 11. (Nedbalová et al., 2017); 12. (Pavlova et al., 2016); 13. (Pichrtová et al., 2014); 14. (Pichrtová et al., 2016); 15. (Richter et al., 2017); 16. (Säwström et al., 2002); 17. (Sciuto et al., 2015); 18. (Sheath & Müller, 1997); 19. (Škaloud et al., 2013); 20. (Stibal et al., 2007); 21. (Stibal et al., 2006); 22. (Vincent & Laybourn-Parry, 2008); 23. (Hodač et al., 2016); 24. (Hoon Kim et al., 2011); 25. (Elvebakk & Prestrud, 1996); 26. (Kim et al., 2008); 27. (Novis et al., 2015); 28. (Heesch et al., 2016); 29. (McKnight et al., 2000); 30. (Kvíderová & Elster, 2013); 31. (Gudmundsdottir et al., 2011); 32. (Remias et al., 2012)

4 Biogeografie

Biogeografickým rozšířením mikroorganismů se zabývá řada studií. V souvislosti s výskytem zelených řas v obou polárních oblastech je diskutována teorie profesora Finlaye o ubikvitním rozšíření mikroorganismů, které je determinováno jejich velikostí (Finlay, 2002). Již studie z 19. století poukazovaly na kosmopolitní rozšíření mikroorganismů. Jednou z nich byla práce Martinuse Willema Beijerincka, který pozoroval, že nalezené druhy mikroorganismů z určitého habitatu na různých geografických místech jsou podobné, ne-li stejné (van Iterson et al., 1983). Mikrobiální eukaryota jsou podle této teorie pravděpodobně rozptýlena náhodnými silami, což znamená, že by i jejich prostorové rozšíření mělo být náhodné. Není ale zřejmé, kdy je tato náhodnost překryta nenáhodným růstem populace v jednotlivých habitatech (Finlay, 2002). Podle Finlaye tedy musí existovat nějaká hraniční velikost, kdy jsou organismy rozšířeny kosmopolitně, nebo naopak mají biogeografie. Tuto hraniční velikost organismu pro kosmopolitní rozšíření odhadl na 1 až 10 mm (Obr. 6), nicméně pro přesné určení velikosti a dalších důležitých faktorů jsou potřeba další studie (Finlay, 2002).



Obr. 6: Hypotetické rozšíření organismů dle jejich velikosti. Graf schematicky zobrazuje přechod mezi druhy s ubikvitním a geograficky omezeným rozšířením, kdy hraniční velikost organismu je dle Finlaye 1-10 mm (upraveno podle Finlay, 2002).

Ve shrnující práci Martiny et al. (2006) postulují čtyři biogeografické hypotézy. První říká, že jsou mikroorganismy náhodně rozmístěné v prostoru. Druhá se opírá o Baas-Beckingovo tvrzení „všechno je všude“, neboli „prostředí (si) vybírá“. To znamená, že mikroorganismy mají tak obrovskou schopnost šíření, že vymazávají dopad evolučních a ekologických událostí. V tomto případě odráží biogeografie mikroorganismů vliv současných ekologických změn. Třetí hypotéza tvrdí, že veškerá prostorová variabilita je způsobena přetrvávajícími účinky historických událostí. Zahrnuje také limitace šíření a dřívější přírodní podmínky, které vedly ke genetické divergenci mikroorganismů. Čtvrtá a poslední hypotéza říká, že distribuce mikroorganismů, stejně i makroorganismů, je dána vlivem historických událostí a zároveň momentálními přírodními podmínkami. Vyvstávají proto dvě základní otázky: první, zdali mají mikroorganismy biogeografii (zda se rozmístění mikroorganismů liší v různých prostředích). A druhá: Pokud se rozmístění mikroorganismů liší v různých lokalitách, je prostorová variabilita způsobena podmínkami prostředí, historickými událostmi nebo obojím?

Mikroorganismy jsou v krajině rozšířeny nenáhodně, což částečně determinují i charakteristiky prostředí (např. salinita, teplota, hloubka vody či nadmořská výška). Tvrzení „všechno je všude“ předpokládá, že všechny mikroorganismy jsou vysoce tolerantní ke stresu, neboť vytvářejí odolná tzv. trvalá stadia. Zástupci skupiny zelených řas jsou schopné vytvářet spory a cysty odolné vůči vysychání a vymrznutí a dokáží v takovém stavu setrvat velmi dlouho (Remias et al., 2016). Aby organismus vytvořil novou populaci, musí být jeho propagule schopná překonat konkurenci místních populací, které jsou adaptované na specifické podmínky. Většina propagulí pasivně se šířících mikroorganismů se dokáže přesunout pouze na malé vzdálenosti, ale malá část se může šířit na vzdálenosti obrovské. Čím větší populace, tím je větší pravděpodobnost rozšíření na delší vzdálenosti. Z mnoha studií vyplývá, že větší hustotu populace mají zpravidla menší organismy (Martiny et al., 2006).

Problematika biogeografie mikroorganismů je shrnuta v práci Izaguirre et al. (2015). Hlavní ekologické znaky mikroorganismů (velká velikost populace, krátká generační doba a velká schopnost disperze) ukazují, že pro biogeografii jsou historické faktory méně důležité než fyzikální a biologické (Dolan, 2005). Skupiny morfologicky stejné jsou považovány za jeden druh (Futuyma, 1998). Nicméně existuje mnoho kryptických druhů morfologicky stejných, ale geneticky různých. Jejich rozšíření se může lišit, což bylo potvrzeno molekulárními analýzami. Dalším problémem v biogeografii mikroorganismů je, že je stále

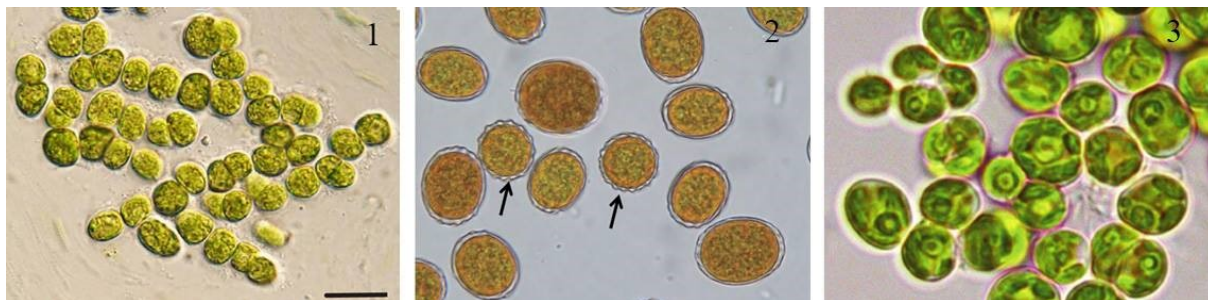
velmi málo vzorků a studií, tudíž je vyšší pravděpodobnost přehlédnutí některých druhů (Darling et al., 2004).

Z pohledu biogeografie jsou zelené řasy v polárních oblastech v porovnání se sinicemi a rozsivkami velmi málo studované (Vyverman et al., 2010). Broady (1996) předpokládal, že většina antarktických terestrických zelených řas jsou kosmopolitní druhy. Nicméně v Antarktidě se předpokládá větší zastoupení endemismu než v Arktidě kvůli větší izolovanosti kontinentu (Elster & Benson 2004; Vyverman et al., 2010). Určení druhů zelených řas pomocí mikroskopie do nižších taxonů je sporné, zvláště v případě skupin, které nejsou morfologicky variabilní, tedy kdy je jejich morfologie velmi redukována (kokální formy) (De Wever et al., 2009). Existuje více příkladů špatného zařazení zelených řas do druhu pomocí morfologie. Známým příkladem je kokální řasa *Chlorella*, která se ukázala být polyfyletická s více rody ve skupině zelených řas (Huss et al., 1999). Molekulární metody proto poskytují zásadní informace pro studium diverzity zelených řas (Leliaert et al., 2012).

De Wever et al. (2009) zkoumali diverzitu zelených řas v antarktických jezerech. Sekvenováním 18S rDNA získali 14 odlišných sekvencí v pěti vzdálených oblastech Antarktidy, přičemž 10 z nich bylo nalezeno vždy pouze v jedné oblasti. Dvě sekvence byly nalezeny zároveň ve dvou oblastech, a další dvě ve třech oblastech zároveň. Žádné sekvence nebyly nalezeny ve více než třech z pěti odebíraných lokalit. Fylogenetické analýzy ukázaly, že většina izolátů patří do skupin Chlorophyceae, Trebouxiophyceae a jeden do Ulvophyceae. Kromě kmenu *Chlorella vulgaris* identického s izolátem z eutrofní nádrže v Nizozemí nebyla žádná sekvence identická se sekvencemi detekovanými mimo Antarktidu, které byly momentálně dostupné v databázi GenBank. Z Antarktidy byly popsány nové druhy zelených řas, které se na základě dosud dostupných dat nevyskytují v jiných geografických oblastech (Obr. 7). Například Škaloud et al. (2013) popsali z jezer na ostrově Jamese Rosse nový druh vláknité řasy *Hazenia broadyi*, dalším příkladem je kokální řasa *Chodatodesmus australis* vyizolovaná z jezírka ve Viktoriině zemi (Sciuto et al., 2015). Za endemický druh Antarktidy je považována i sněžná řasa *Chloromomas polyptera*, která způsobuje oranžové zabarvení sněhu v maritimní Antarktidě (Remias et al. 2013).

Podporu teorie o převažujícím endemismu antarktických fotoautotrofních mikroorganismů (rozsivek, zelených řas a sinic) představuje práce Vyvermana et al. (2010). Nízká druhová podobnost (příbuznost) mezi severním a jižním pólem poukazuje na nízkou schopnost jejich šíření a tím tyto druhy vykazují celkově omezené geografické rozšíření. Například rozsivky, které jsou více závislé na migraci ptáků a jiných zvířat, vykazují větší míru

endemismu. Podle autorů jsou tato zjištění v souladu s tím, co bylo vyzkoumáno pro jiné taxonomické skupiny, jako jsou roztoči či chvostoskoci, u kterých se předpokládá existence glaciálních refugií a tedy dlouhodobé geografické oddělení v řádu mnoha milionů až desítek milionů let (Convey & Stevens, 2007).



Obr. 7: Ukázka potenciálně endemických zelených řas z Antarktidy: **1** *Hazenia broadyi* (Škaloud et al., 2013), **2** *Chloromonas polyptera* (Remias et al., 2013), **3** *Chodatodesmus australis* (Sciuto et al., 2015)

Naproti tomu ve studii Hodač et al. (2016) autoři posilují teorii o kosmopolitním rozšíření mikroskopických zelených řas na příkladu rodů *Chlorella* (Obr.8) a *Stichococcus*, jakožto morfologicky jednoduchých a větrem šířených organismů. Studovali rozšíření kmenů z těchto rodů v polárních, temperátních a tropických oblastech pomocí fylogenetické analýzy 18S rDNA a ITS2 rDNA. V porovnání s morfologickým přístupem našli daleko větší diverzitu, nicméně když porovnali sekvence z jednotlivých klimatických oblastí, zjistili velkou podobnost. V souladu se závěry této práce Nedbalová et al. (2017) izolovali kmeny z rodu *Monoraphidium* (Obr. 8) z jezer na ostrově Jamese Rosse na Antarktickém poloostrově, které se ukázaly být na úrovni sekvencí 18S rDNA totožné s kmenem z potoka v Německu. Existují tedy důkazy, že některé kokální řasy vyskytující se v Antarktidě mají široké geografické rozšíření. Teorii o ubikvitním rozšíření skupiny zelených řas v polárních oblastech posiluje i nalezení kosmopolitně rozšířené řasy z rodu *Chloromonas* v půdních krustách (Rippin et al., 2018). Ubikvitní rozšíření sněžných řas naznačuje i studie Lutz et al. (2016), ve které autoři pomocí metagenomové analýzy 18S rDNA ze 40 vzorků z 16 ledovců v Arktidě (Svalbard, Grónsko, Island a Švédsko) zjistili, že zastoupení druhů ve společenstvech a jejich relativní abundance je velice podobná napříč Arktidou, i přes obrovské vzdálenosti a různé fyzikálně chemické vlastnosti prostředí. Avšak Segawa et al. (2018) se domnívají, že jejich metoda není vhodná pro studium rozšíření sněžných řas, protože gen pro 18S rRNA není dostatečně variabilní (Obr.8). Ve své studii tedy využili variabilní ITS2 rRNA a došli k výsledku, že řada

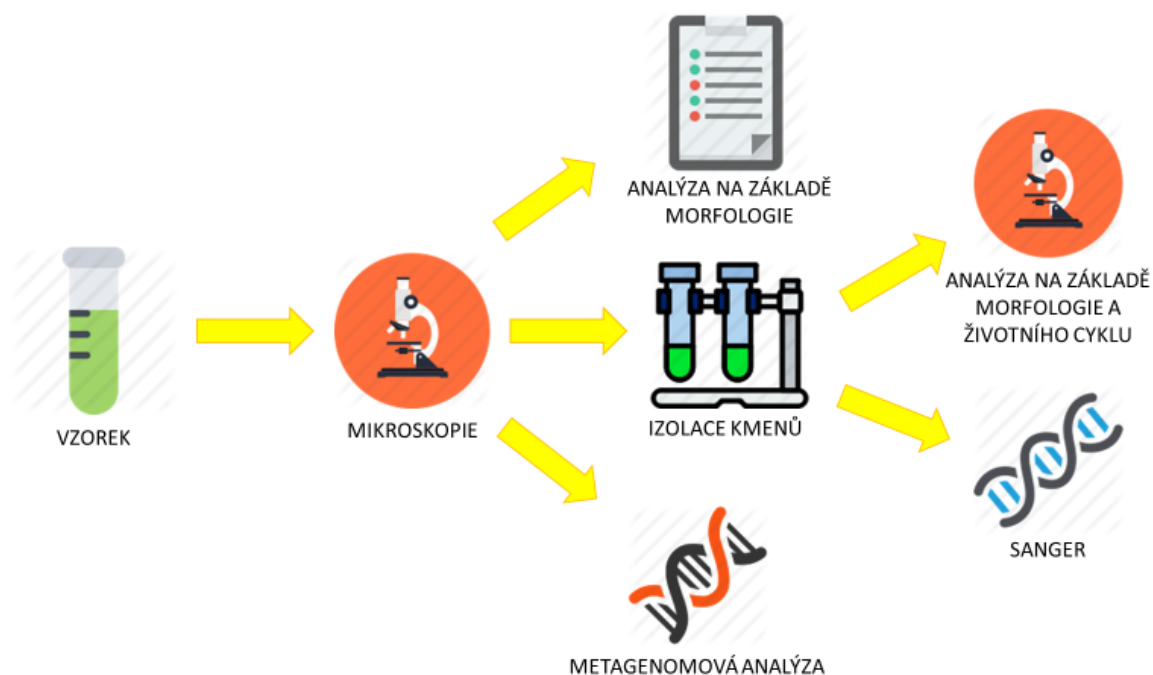
sněžných řas je regionálně endemických a mají tedy jistá omezení v šíření. Oproti Lutz et al. (2016) našli pouze 1,9 % unikátních sekvencí rozšířených v celé Arktidě. V Antarktidě chyběly zcela. Jejich výsledky ukazují, že několik kosmopolitně rozšířených zástupců zelených řas dominuje v habitatu červených sněhů, nicméně v nich bylo nalezeno také množství endemitů. Již zmíněný druh *Chloromonas polyptera* způsobující oranžový sníh studovali Remias et al. (2013) ve dvou oblastech Antarktického poloostrova. Na těchto lokalitách bylo relativně velké množství živin způsobené přítomností ptačích exkrementů. Tato sněžná řasa byla zatím nalezena pouze na těchto lokalitách, nicméně blízké příbuzné druhy rodu *Chloromonas* byly nalezeny na Svalbardu či v Alpách, kde množství živin bylo výrazně nižší. Porovnávali sekvence *rbcL* a 18S rDNA a domnívají se, že pro budoucí studie by využití markeru ITS mělo vyjasnit identitu druhů různých geografických populací.



Obr. 8: Ukázka kosmopolitních zelených řas: 1 sněžná řasa *Chlamydomonas* cf. *nivalis* (Segawa et al., 2018), 2 *Monoraphidium* sp. (Nedbalová et al., 2017), 3 *Chlorella vulgaris* (Hodač et al., 2016).

5 Metody studia diverzity

Vývoj metod studia diverzity mikroorganismů je zvláště v posledních desetiletích velmi rychlý. Vše začalo v roce 1676, kdy Antoni van Leeuwenhoek poprvé pozoroval mikroorganismy pomocí mikroskopu. Poté v roce 1888 izoloval Robert Koch mikroorganismy za použití pevných kultur. Důležitým mezníkem byl rok 1977, kdy metoda vyvinutá Frederickem Sangerem a jeho kolegy umožnila rutinní sekvenování dlouhých řetězců DNA, to otevřelo prostor pro zkoumání mikroorganismů na molekulární úrovni. Na začátku nového tisíciletí pak již bylo možné využít metagenomové analýzy pro studium směsných přírodních vzorků (Sanger et al., 1977; Escobar-Zepeda et al., 2015). V následujících kapitolách bude pojednáno o využití různých metod pro studium diverzity zelených řas (Obr. 9).



Obr. 9: Schéma možných způsobů zpracování přírodního vzorku využitelných pro hodnocení diversity zelených řas. Jednotlivé obrázky z www.iconfinder.com.

5.1 Světelná mikroskopie

Mikroorganismy jsou určovány pomocí světelné mikroskopie po více než 350 let (Caron et al., 2012) a tato metoda je stále jedna ze základních technik ve většině studií popisujících druhové složení a také v aplikované sféře, například při hodnocení kvality vody. Koneckonců studium mikroorganismů bylo po 300 let založeno pouze na morfologii a případně zkoumání životního cyklu na základě přírodních vzorků či laboratorních kultur (Fott, 1974). Buňky zelených řas bývají často velmi malé a morfologicky jednoduché, proto není často snadné určovat zástupce této skupiny pouze pomocí světelného mikroskopu (Neustupa et al., 2011; Xiao et al., 2014). Využití světelné mikroskopie je sice levné a rychlé v porovnání s molekulárními přístupy, ale vyžaduje značnou zkušenost (Rippin et al., 2018). Například u sněžných řas rodu *Chlamydomonas* a *Chloromonas* dochází k velkým změnám v morfologii v průběhu jejich životního cyklu, proto je jejich určení pomocí mikroskopie velmi náročné (Lutz et al., 2017). Nyní má tato technika ve srovnání s molekulárními přístupy pouze omezený přínos pro výzkum mikroorganismů, ale je samozřejmě stále velmi důležitá a používaná zejména pro základní determinaci a popis vzorku.

5.2 Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie v posledních devadesáti letech umožňuje pozorovat objekty pod velmi velkým zvětšením, řádově až 1 000 000x. Díky vývoji technologie se stále zlepšuje rozlišovací schopnost a hloubka ostrosti (Nebesářová, 2001).

5.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronový mikroskop (SEM) umožňuje detailně pozorovat vnější strukturu zkoumaného objektu ve vakuu. Jeho velkou předností oproti světelnému mikroskopu je jeho velká hloubka ostrosti a v důsledku toho se zdají být snímky trojrozměrné. SEM využívá elektronů, které postupně dopadají na všechna místa vzorku, ty jsou odražené od jeho povrchu a poté se převádí na viditelný obraz. Objekt, který chceme pozorovat, v tomto případě buňky zelených řas (Obr. 10), musí být zafixovaný, vysušený a potažený malou vrstvičkou těžkého kovu, často zlatem (Nebesářová, 2001). Rozdíly v morfologii buněk zelených řas pozorované pomocí SEM mohou být klíčové pro určování jednotlivých druhů (Procházková et al., 2018).



Obr. 10: Vnější struktura aplanozygoty sněžné řasy *Chloromonas nivalis* (fotografie ze skenovacího elektronového mikroskopu, měřítko 1 μ m) (Procházková et al., 2018).

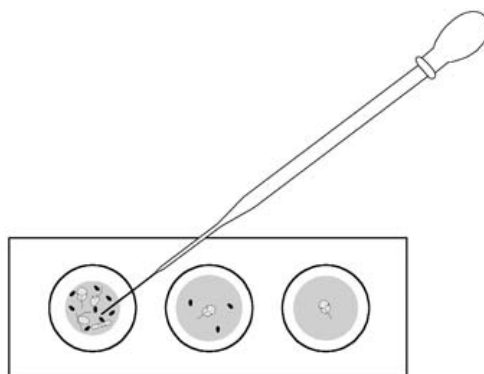
5.2.2 Transmisní elektronová mikroskopie

Transmisní elektronový mikroskop (TEM) je při studiu zelených řas využíván pro zobrazení jejich buněčné stěny a vnitřních struktur, jako je chloroplast, mitochondrie, jádérko, Golgiho aparát, škrobová zrna či třeba pyrenoid (Nishikawa et al., 2003). Proto má v případě zelených řas využití zejména při zařazení do rodu, kdy se porovnávají jednotlivé struktury buněk (Neustupa et al., 2011). Slovo „transmisní“ je odvozeno z toho, že elektrony procházejí skrz vzorek a teprve potom jsou zachycené. Proto musí být urychlovací napětí vysoké a vzorek musí být velmi tenký, do tloušťky 100 nm. Před samotným pozorováním je

opět nutné vzorek zafixovat a vytvořit tenké řezy pomocí diamantového nože. Vzorek také nesmí obsahovat vodu, protože je v mikroskopu vystaven vysokému vakuu (Nebesářová, 2001).

5.3 Izolační techniky a kultivace

Pro přípravu vzorků na sekvenování pomocí Sangerovy metody a pro případné detailní studium životního cyklu je potřeba nejprve získat čistou jednodruhovou kulturu. Toho lze dosáhnout několika způsoby. Prvním způsobem je izolace jednotlivých buněk pomocí mikropipety. Používá se Pasteurova pipeta nebo skleněná kapilára, která je na jedné straně zúžená a tato část se za vysoké teploty nad plamenem protáhne a ulomí, aby se na tomto konci vytvořila tenká kapilára s průměrem o něco větším, než je průměr buňky. Samotná izolace se provádí přes několik kapek média za použití světelného mikroskopu. Nejdříve pomocí kapiláry nabereme více buněk, které přesuneme do druhé kapky a poté pokračujeme do té doby, než se podaří získat jedinou námi vybranou buňku (Obr. 11, Andersen, 2005).



Obr. 11: Technika izolace jednotlivých buněk pomocí mikropipety přes více kapek (Andersen, 2005).

Další metodou je izolace za použití agaru, která je vhodná zejména pro kokální a půdní řasy. Tato metoda je docela častá, a již dlouho používaná. Některé vláknité řasy na agaru nerostou, ale jiným, např. zástupcům rodu *Chlamydomonas* se na agaru daří mnohem lépe. Na agarovou destičku se environmentální vzorek rozmístí a po nějaké době začnou růst oddělené kolonie buněk. Tento způsob umožňuje redukovat počet druhů z původně směsného vzorku, někdy dokonce získat kolonii buněk stejného druhu (Andersen, 2005).

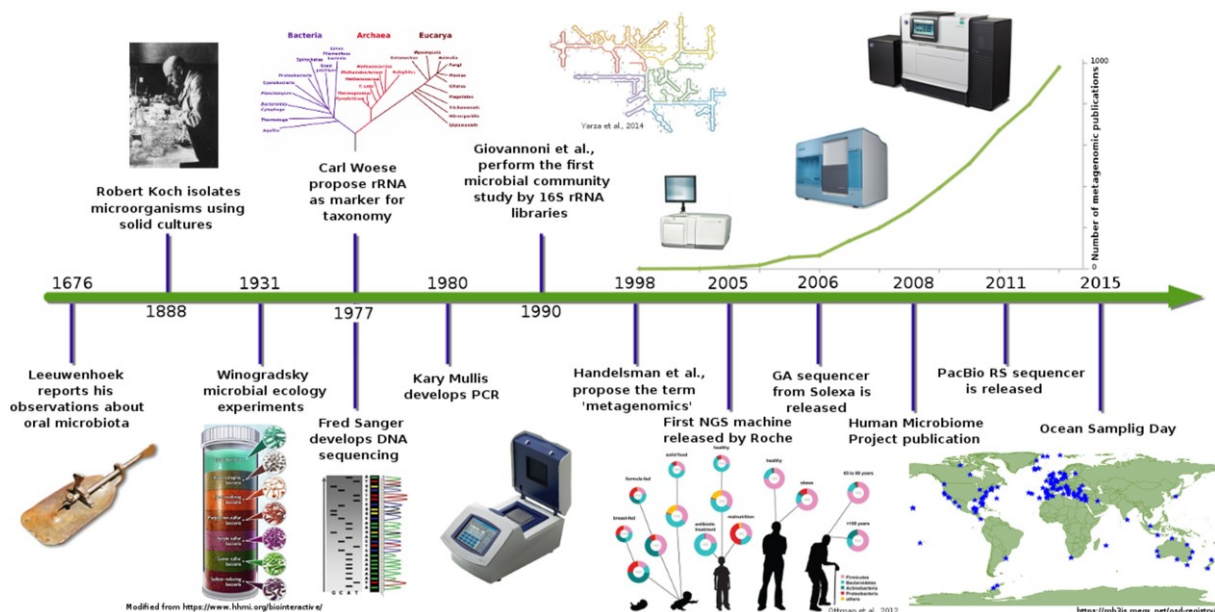
Další dlouho známou a často používanou metodou je technika ředěním. Je efektivní pro druhy spíše hojné, ale pro vzácné druhy ve vzorku je nevýhodná. Pokud známe koncentraci

buněk ve vzorku, jsme z toho schopni vypočítat jaký objem (např. jedna kapka, 50 μ l, 1 ml) bude potřeba přesunout do další jamky vícejamkové destičky s médiem či destilovanou vodou. Tato technika je založená na postupném snižování koncentrace buněk v roztoku (Andersen, 2005).

Aby byly organismy schopné růst v laboratorních podmínkách, je potřeba, aby se přiblížily podmínkám v prostředí, ve kterém se vyskytují. To znamená optimální teplota, intenzita a délka světla za den. Potřebné živiny a stopové prvky zajišťuje kultivační médium. Některá média byla vytvořena na základě studie potřeby živin daného organismu či po zohlednění přírodního prostředí. Pro kultivaci sladkovodních zelených řas se nejčastěji používá Boldovo základní médium (Bold's Basal Medium – BBM (Bischoff & Bold, 1963)), existuje ale mnoho dalších. Samotná kultivace řas se dá provádět v otevřených či uzavřených systémech (Andersen, 2005).

5.4 Molekulární metody studia diverzity

V posledních desetiletích je studium mikroorganismů podpořeno molekulárními nástroji umožňujícími hlubší poznání diverzity mikroorganismů (Izaguirre et al., 2015). Časový vývoj metod studia mikroorganismů ukazuje Obr. 12. DNA je možné sekvenovat pomocí Sangerovy metody, která vyžaduje ideálně čistou jednodruhovou kulturu buněk, nebo pomocí metagenomové analýzy (sekvenování nové generace – „next-generation sequencing“), kdy je možné charakterizovat enviromentální vzorek. Sekvenování Sangerovou metodou vyžaduje předchozí kultivaci a/nebo izolaci jednotlivých druhů. Současné metody sekvenování nové generace razí cestu pro vysoce výkonnou („high-throughput“) detekci mikroorganismů bez nutnosti kultivace v laboratoři (Ebenezer et al., 2012; Shokralla et al., 2012). Sekvenování nové generace je velmi hodnotný nástroj, pomocí kterého je možné detekovat i málo časté druhy ve vzorku, které není možné zachytit pomocí tradičních metod.



Obr. 12: Časový vývoj metod studia diverzity mikroorganismů s důležitými mezníky. (Escobar-Zepeda et al., 2015).

5.4.1 Porovnání Sangerovy metody a metagenomové analýzy

Sekvenování Sangerovou metodou umožňuje získat delší sekvence, ale zato jejich mnohonásobně menší počet. I díky nutné předchozí kultivaci řas máme možnost detailně prozkoumat životní cyklus, ekofyziologii a morfologii daného druhu. Samozřejmě jsme omezení tím, že nekultivovatelné druhy takto nebudeme schopni podchytit. Velká výhoda metagenomové analýzy je to, že jsme touto metodou schopni podchytit i nekultivovatelné a vzácné druhy ve vzorku. Dostaneme sice obrovský počet sekvencí, ale v porovnání se Sangerovou metodou, jsou velice krátké. Proto je mnohdy obtížné přiřadit tyto sekvence k určitému organismu. Sekvenováním genu pro 18S rRNA, který je hojně zastoupen v databázích, je možné zařadit organismy vyskytující se ve vzorku pouze na vyšší taxonomické úrovni. Nekódující úsek ITS rRNA je sice mnohem variabilnější, avšak v databázích je zastoupen mnohem méně (Obr. 13). A tak i proto bude obtížnější přiřadit sekvenci k určitému druhu. Obě metody mají jistá omezení, ale přesto přinesly a v budoucnosti jistě přinesou mnoho informací pro zkoumání diverzity zelených řas.

Poprvé v historii sekvenování DNA není takovým problémem samotná data získat, ale v případě metagenomové analýzy je poté zpracovat. To vyžaduje značné bioinformatické zkušenosti a schopnosti. Pro zpracování dat ze sekvenátorů nové generace bylo již vyvinuto mnoho programů. Jednou z možností je práce v příkazovém řádku v Linuxu nebo uživatelsky jednodušší a příjemnější např. bezplatné Galaxy (Afgan et al., 2016) či UGENE

(Okonechnikov et al., 2012). Z placených třeba Illumina BaseSpace, který je přímo určený pro data získaná od Illuminy, nevýhodou může být neaktuálnost z důvodu placeného softwaru a nutnosti jeho testování.

Izolace kmenů + Sanger Metagenomová analýza

- | | |
|--|--|
| • 1 kmen | • Směsný vzorek |
| • Až cca 1500 bp fragment | • Cca 400 bp fragment |
| • Sekvenování jednotlivých genů | • Miliony fragmentů sekvenovány najednou |
| • 18S rDNA, ITS2 rDNA, rbcL | • 18S rDNA, ITS2 rDNA |
| • Detailní prozkoumání životního cyklu, ekofyziologie a morfologie | • Podchycení celého společenstva včetně vzácných |
| • „potvrzení“ metagenomové analýzy | • Často obtížné přiřazení ke konkrétnímu organismu (krátké sekvence -18S rDNA, malé zastoupení v databázi - ITS2 rDNA) |
| • Dlouhé sekvence | |

Obr. 13: Porovnání Sangerovy metody sekvenování + izolace kmenů a metagenomové analýzy.

5.4.2 Geny využívané pro fylogenetické studium zelených řas

Využití genů ribosomální RNA jako molekulárních markerů (Woese & Fox, 1977) v kombinaci se Sangerovou metodou sekvenování (Sanger et al., 1977) bylo velmi důležitým krokem pro klasifikaci mikroorganismů. Existuje více možností použitých markerů při porovnávání organismů ve fylogenetických studiích. Pro studium zelených řas se nejčastěji používá gen malé ribosomální podjednotky - 18S rRNA, nekódující úsek ITS (internal transcribed spacer) nebo chloroplastový marker rbcL (gen pro větší podjednotku enzymu Rubisco, který mají všechny fotosyntetizující organismy). Ribosomální RNA lze nalézt ve všech živých organismech a v genomu se vyskytuje ve více kopiích. Gen pro 18S rRNA je často využíván, protože obsahuje konzervované okrajové segmenty. Jsme tak schopni zařadit zkoumané organismy na vyšší taxonomické úrovni, nicméně blízké příbuzné druhy tak nemusí být kvůli jeho konzervativnosti od sebe rozlišeny. ITS nacházející se mezi geny malé a velké ribosomální podjednotky, je kratší než gen 18S rRNA, ale je variabilnější. Mezi geny pro 18S a 5.8S rRNA se nachází úsek označovaný jako ITS1 a mezi geny pro 5.8S a 25S rRNA se nachází ITS2. Díky poměrně rychlé evoluci úseku ITS je možné od sebe rozlišit i blízké příbuzné druhy nebo dokonce poddruhy (Procházková et al., 2018). Při studiu zelených řas

se též často využívá modelování sekundární struktury úseku ITS2, která obsahuje čtyři helixy. Přítomnost tzv. kompenzačních záměn bazí v konzervovaných úsecích struktury je pak kritériem pro rozhodnutí, zda se jedná o různé biologické druhy (Coleman, 2009).

Z publikovaných studií vyplývá, že není možné vybrat jen jeden marker, který by se hodil pro všechny fylogenetické studie. Proto je dobré využívat kombinaci více genů (Leliaert et al., 2012; Hadi et al., 2016).

Studie založené na sekvenování kompletní 18S rDNA pomocí Sangerovy metody byly důležité pro získání množství informací o mikrobiální diverzitě v různých habitatech. Byly ale limitované relativně malým množstvím získaných sekvencí. Tato omezení byla překonána s příchodem vysoce výkonného sekvenování („high throughput sequencing“ – HTS) především na platformě Illumina (Massana, 2015).

5.4.3 Využití polyfázického přístupu pro studium diverzity zelených řas v polárních oblastech

V této kapitole je zpracován přehled publikovaných prací, které využívají kombinaci molekulárních, morfologických a případně ekofyziologických metod pro studium diverzity zelených řas v polárních oblastech. Ačkoliv je zřejmé, že samostatné použití těchto metod s sebou přináší řadu omezení, je prací aplikujících tzv. polyfázický přístup (viz např. Leliaert & Pröschold, 2007) zatím poměrně malé množství.

V dosud jediné studii, která se zaměřila na zelené řasy a zahrnovala rozsáhlý soubor sladkovodních lokalit, de Wever et al. (2009) zkoumali 33 vzorků z antarktických jezer pomocí klasických a molekulárních metod. Studie potvrdila velkou fylogenetickou diverzitu zelených řas v antarktických jezerech a naznačila endemismus na různých taxonomických úrovních. Otázkou je, do jaké míry byly závěry práce ovlivněny malým zastoupením sekvencí z jiných geografických oblastí.

Škaloud et al. (2013), Sciuto et al. (2015) a Nedbalová et al. (2017) využili ve svých studiích sekvenování genu pro 18S rRNA a nekódujícího úseku ITS2 rRNA v kombinaci s mikroskopií, případně ekofyziologickými daty, což umožnilo přesnější taxonomické zařazení nově popsaných druhů.

Rippin et al. (2018) zjišťovali rodovou bohatost řas a sinic v půdních krustách ze Svalbardu (Arktida) a ostrova Livingston (Antarktický poloostrov) a porovnávali přitom molekulární a morfologický přístup. Kombinací obou přístupů bylo celkem nalezeno 143 arktických a 103 antarktických rodů. Pouze 15 arktických a 7 antarktických rodů bylo nalezeno současně oběma přístupy. Počet determinovaných rodů pomocí molekulárního

přístupu byl zhruba jedenáctkrát vyšší, než umožňoval morfologický přístup. To mohlo být způsobeno nemožností kultivovat velké množství rodů řas a sinic a komplikované determinace na základě morfologie v případě zelených řas. Překvapivě ale ani pomocí metagenomové analýzy sekvenováním malé ribozomální podjednotky rRNA nebyly nalezeny všechny rody určené pomocí světelné mikroskopie. Použitím metagenomové analýzy jsme sice teoreticky schopni podchytit všechny druhy ve společenstvu, ale jsme stále závislí na kompletním a přesném referenčním datasetu a je velmi obtížné identifikovat druhy, které chybějí nebo nejsou v databázi identifikované. Dále také může dojít k chybě při polymerázové řetězové reakci či při samotném sekvenování, a to může zkreslit výsledky.

Vyverman et al. (2010) upozorňuje, že data ze sekvenování nové generace by měla být interpretována s opatrností, případně v porovnání s jinými molekulárními technikami (Sanger) a tradičními morfologickými přístupy.

Nejdetailněji prostudovanou psychrofilní zelenou řasou je patrně *Chlamydomonas raudensis*, která je adaptována na život v extrémních podmínkách trvale zamrzlých antarktických jezer s nízkými teplotami a extrémně nízkou intenzitou záření v modrozelené části spektra (Morgan-Kiss et al., 2008). Mnoho laboratoří po celém světě zkoumá na izolátu UWO241 adaptace na úrovni buněčných procesů, membrán, proteinů sloužících jako nemrznoucí směsi, její fotosyntézu a reakce na environmentální stres. Stala se tak modelovým organismem pro studium adaptací psychrofilních řas. Takto komplexní výzkum může mít dalekosáhlé implikace například při hodnocení vlivu řas na hladinu CO₂ v atmosféře při globální změně klimatu (Dolhi et al., 2013).

6 Závěr

Polární oblasti představují rozsáhlé území s extrémními podmínkami na Zemi. Díky komplexním, a přesto jednodušším systémům než v jiných geografických oblastech, je možné snadněji pochopit ekologii organismů. Sladkovodní habitaty polárních oblastí, tedy jezera, potoky a řeky, mokřady, ledovce a sněhová pole zde představují důležité a dynamické ekosystémy. Fotoautotrofní organismy zde musí odolávat extrémním podmínkám, zpravidla nízkým teplotám, nízkým koncentracím živin, několika měsícům v roce bez slunečního záření a zároveň období bez tmy během relativně krátké vegetační sezóny. Zelené řasy (Chlorophyta) jsou zde důležitou skupinou primárních producentů. I přes zdánlivě podobné podmínky v Arktidě a Antarktidě existují značné ekologické rozdíly mezi jejich sladkovodními habitaty.

V rámci rešeršní práce byl zpracován přehled výskytu rodů zelených řas v jednotlivých sladkovodních habitatech polárních oblastí. Nejvíce zastoupené byly třídy Chlorophyceae a Trebouxiophyceae a nejvíce rodů se vyskytovalo v jezerech. Zjištěné počty rodů jsou však zcela jistě významně podhodnocené kvůli poměrně nízkému počtu dostupných studií, což se týká zejména mokřadních habitatů.

Rozšíření zelených řas se zdá být spíše kosmopolitní, nicméně jak vyplývá ze zmíněných studií, není zatím možné zodpovědět otázku, zda jsou druhy z této skupiny spíše endemické či kosmopolitně rozšířené. Biogeografii mikroorganismů ovlivňuje mnoho faktorů, jako je velikost buňky, schopnost šíření, tolerance ke stresu, schopnost rychlého růstu populace a mnoho dalších.

Vývoj metod studia diverzity mikroorganismů se zvláště v posledních letech velmi zrychlil. Dříve bylo studium diverzity zelených řas založeno pouze na morfologické determinaci pomocí světelného mikroskopu. Rozvoj molekulárních metod umožnila v 70. letech 20. století Sangerova metoda sekvenování dlouhých řetězců DNA. Na začátku nového tisíciletí již bylo možné sekvenovat i směsné vzorky pomocí sekvenování nové generace, a tedy i podchycení nekultivovatelných či vzácných druhů ve vzorku. Tyto metody nám přináší mnoho informací, nicméně je dobré je používat v kombinaci s jinými a výsledky interpretovat s opatrností. Integrace výše zmíněných metod umožňuje detailní prozkoumání diverzity, fylogenetického postavení, morfologie, životního cyklu a ekofyziologie zelených řas. Tento přístup však byl dosud aplikován jen v malém množství studií.

7 Literární zdroje

- Afgan, E., Baker, D., van den Beek, M., Blankenberg, D., Bouvier, D., Čech, M., Chilton J., Clements D., Eberhard C., Grüning B., Guerler A., Hillman-Jackson J., von Kuster G., Rasche E., Soranzo N., Turaga N., Taylor J., Nekrutenko A., Goecks, J. (2016). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W3–W10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw343>
- Amengual-Morro, C., Moyà Niell, G., & Martínez-Taberner, A. (2012). Phytoplankton as bioindicator for waste stabilization ponds. *Journal of Environmental Management*, 95(SUPPL.), S71–S76. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.07.008>
- Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Amsterdam: Elsevier.
- Anesio, A. M., Lutz, S., Chrismas, N. A. M., & Benning, L. G. (2017). The microbiome of glaciers and ice sheets. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 3(1), 10. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0019-0>
- Becker, B., & Marin, B. (2009). Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Annals of Botany*, 103(7), 999–1004. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp044>
- Bischoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). Some soil algae from enchanted rock and related algae species. *Phycological Studies*, 44(1), 1–95.
- Broadly, P. A. (1996). Diversity, distribution and dispersal of Antarctic terrestrial algae. *Biodiversity and Conservation*, 5(11), 1307–1335. <https://doi.org/10.1007/BF00051981>
- Brodie, J., & Lewis, J. (Jane M. . (2007). *Unravelling the Algae : the Past, Present, and Future of Algal Systematics*. CRC Press.
- Butler, H. G., Edworthy, M. G., & Ellis-Evans, J. C. (2000). Temporal plankton dynamics in an oligotrophic maritime Antarctic lake. *Freshwater Biology*, 43(2), 215–230. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2000.00542.x>
- Caron, D. A., Countway, P. D., Jones, A. C., Kim, D. Y., & Schnetzer, A. (2012). Marine protistan diversity. *Annual Review of Marine Science*, 4(1), 467–493. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142802>
- Coleman, A. W. (2009). Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50(1), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.10.008>
- Convey, P., & Stevens, M. I. (2007). Antarctic biodiversity. *Science*, 317(5846), 1877–1878. <https://doi.org/10.1038/nature05827>
- Darling, K. F., Kučera, M., Pudsey, C. J., & Wade, C. M. (2004). Molecular evidence links cryptic diversification in polar planktonic protists to Quaternary climate dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(20), 7657–7662. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402401101>
- De Wever, A., Leliaert, F., Verleyen, E., Vanormelingen, P., Van der Gucht, K., Hodgson, D. A., Sabbe K. & Vyverman, W. (2009). Hidden levels of phylodiversity in Antarctic green algae: further evidence for the existence of glacial refugia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1673), 3591–3599. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0994>

- Dolan, J. (2005). An introduction to the biogeography of aquatic microbes. *Aquatic Microbial Ecology*, 41(1), 39–48. <https://doi.org/10.3354/ame041039>
- Dolhi, J. M., Maxwell, D. P., & Morgan-Kiss, R. M. (2013). Review: The Antarctic *Chlamydomonas raudensis*: An emerging model for cold adaptation of photosynthesis. *Extremophiles*, 17(5), 711–722. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0571-3>
- Ebenezer, V., Medlin, L. K., & Ki, J. S. (2012). Molecular detection, quantification, and diversity evaluation of microalgae. *Marine Biotechnology*, 14(2), 129–142. <https://doi.org/10.1007/s10126-011-9427-y>
- Edwards, A., Anesio, A. M., Rassner, S. M., Sattler, B., Hubbard, B., Perkins, W. T., Young M. & Griffith, G. W. (2011). Possible interactions between bacterial diversity, microbial activity and supraglacial hydrology of cryoconite holes in Svalbard. *ISME Journal*, 5(1), 150–160. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.100>
- Elster, J., & Benson, E. (2004). Life in the polar terrestrial environment with a focus on algae and cyanobacteria. In *Life in the Frozen State* (pp. 111–150). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203647073.ch3>
- Elvebakk, A., & Prestrud, P. (1996). A catalogue of Svalbard plants, fungi, algae and cyanobacteria: Part 8. Marine microalgae. *Norsk Polarinstitutt, Skrifter*, 375–382.
- Escobar-Zepeda, A., De León, A. V. P., & Sanchez-Flores, A. (2015). The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers in Genetics*, 6(348), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00348>
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- Finlay, B. J. (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296(5570), 1061–1063. <https://doi.org/10.1126/science.1070710>
- Fott, B. (1974). The phylogeny of eucaryotic algae. *Taxon*, 23(4), 449–461.
- Gudmundsdottir, R., Olafsson, J. S., Palsson, S., Gislason, G. M., & Moss, B. (2011). How will increased temperature and nutrient enrichment affect primary producers in sub-Arctic streams? *Freshwater Biology*, 56(10), 2045–2058. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02636.x>
- Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there? *Journal of Phycology*, 48(5), 1057–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x>
- Hadi, S. I. I. A., Santana, H., Brunale, P. P. M., Gomes, T. G., Oliveira, M. D., Matthiensen, A., Oliveira M. E. C., Silva F. C. P. & Brasil, B. S. A. F. (2016). DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PLoS ONE*, 11(2), e0149284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149284>
- Hawes, I. (1988). The seasonal dynamics of *Spirogyra* in a shallow, maritime Antarctic lake. *Polar Biology*, 8(6), 429–437. <https://doi.org/10.1007/BF00264719>
- Hawes, I. (1989). Filamentous green algae in freshwater streams on Signey Island, Antarctica. *Hydrobiologia*, 172, 1–18.
- Hawes, I., & Brazier, P. (1991). Freshwater stream ecosystems of James Ross Island, Antarctica. *Antarctic Science*, 3(3), 265–271.

- Heesch, S., Pažoutová, M., Moniz, M. B. J., & Rindi, F. (2016). Prasiolales (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) of the Svalbard Archipelago: diversity, biogeography and description of the new genera *Prasionella* and *Prasionema*. *European Journal of Phycology*, 51(2), 171–187. <https://doi.org/10.1080/09670262.2015.1115557>
- Hodač, L., Hallmann, C., Spitzer, K., Elster, J., Faßhauer, F., Brinkmann, N., Lepka D., Diwan V. & Friedl, T. (2016). Widespread green algae *Chlorella* and *Stichococcus* exhibit polar-temperate and tropical-temperate biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8), 1–16. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw122>
- Hodson, A., Anesio, A. M., Tranter, M., Fountain, A., Osborn, M., Priscu, J., Laybourn-Parry J. & Sattler, B. (2008). Glacial ecosystems. *Ecological Monographs* 78(1), 41–67. <https://doi.org/10.1890/07-0187.1>
- Hoon Kim, G., Klochkova, T. A., Won Han, J., Kang, S. H., Gu Choi, H., Wha Chung, K., & Ja Kim, S. (2011). Freshwater and terrestrial algae from Ny-Alesund and Blomstrandhalvoya island (Svalbard). *Arctic*, 64(1), 25–31. <https://doi.org/10.14430/arctic4077>
- Huss, V. A. R., Frank, C., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., Wenzeler P. & Kessler, E. (1999). Biochemical and molecular phylogeny taxonomy of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 35(3), 587–598.
- Izaguirre, I., Mataloni, G., Allende, L. U. Z., & Vinocur, A. (2001). Summer fluctuations of microbial planktonic communities in a eutrophic lake — Cierva Point , Antarctica. *Journal of Plankton Research*, 23(10), 1095–1109. <https://doi.org/10.1093/plankt/23.10.1095>
- Izaguirre, I., Saad, J. F., Romina Schiaffino, M., Vinocur, A., Tell, G., Sánchez, M. L., Allende L. & Sinistro, R. (2015). Drivers of phytoplankton diversity in Patagonian and Antarctic lakes across a latitudinal gradient (2150 km): The importance of spatial and environmental factors. *Hydrobiologia*, 764(1), 157–170. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2269-2>
- Jónasson, P. M. (1992). The ecosystem of Thingvallavath: a synthesis. *Oikos*, 64(1), 405–434.
- Kim, G. H., Klochkova, T. a, & Kang, S. H. (2008). Notes on freshwater and terrestrial algae from Ny-Alesund, Svalbard (high Arctic sea area). *Journal of Environmental Biology / Academy of Environmental Biology, India*, 29(4), 485–491. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20140452>
- Kvídiová, J., & Elster, J. (2013). Standardized algal growth potential and/or algal primary production rates of maritime Antarctic stream waters (King George Island, South Shetlands). *Polar Research*, 32(1), 11191. <https://doi.org/10.3402/polar.v32i0.11191>
- Kvídiová, J., Shukla, S. P., Pushparaj, B., & Elster, J. (2017). Perspectives of low-temperature biomass production of polar microalgae and biotechnology expansion into high latitudes. In *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology: Second Edition* (pp. 585–600). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57057-0_25
- Laybourn-Parry, J., & Pearce, D. A. (2007). The biodiversity and ecology of Antarctic lakes: models for evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1488), 2273–2289. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1945>
- Leliaert, F., & Pröschold, T. (2007). Systematics of the green algae. In *Unravelling the Algae: the Past, Present, and Future of Algal Systematics* (pp. 123–153). Taylor and Francis. <https://doi.org/10.1201/9780849379901.ch7>

- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>
- Lutz, S., Anesio, A. M., Edwards, A., & Benning, L. G. (2017). Linking microbial diversity and functionality of arctic glacial surface habitats. *Environmental Microbiology*, 19(2), 551–565. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13494>
- Lutz, S., Anesio, A. M., Raiswell, R., Edwards, A., Newton, R. J., Gill, F., & Benning, L. G. (2016). The biogeography of red snow microbiomes and their role in melting arctic glaciers. *Nature Communications*, 7, 11968. <https://doi.org/10.1038/ncomms11968>
- Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J. M., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., Horner-Devine M. C., Kane M., Krumins J. A., Kuske Ch. R., Morin P. J., Naeem S., Øvreås L., Reysenbach A. L., Smith V. L & Staley, J. T. (2006). Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2), 102–112. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1341>
- Massana, R. (2015). Getting specific: Making taxonomic and ecological sense of large sequencing data sets. *Molecular Ecology*, 24(12), 2904–2906. <https://doi.org/10.1111/mec.13210>
- Mataloni, G., Vinocur, A., & De Tezanos Pinto, P. (2005). Abiotic characterization and epilithic communities of a naturally enriched stream at Cierva Point, Antarctic Peninsula. *Antarctic Science*, 17(2), 163–170. <https://doi.org/10.1017/S0954102005002579>
- McKnight, D. M., Gooseff, M. N., Vincent, W. F., & Peterson, B. J. (2008). High-latitude rivers and streams. In *Polar Lakes and Rivers: Limnology of Arctic and Antarctic Aquatic Ecosystems* (pp. 83–102). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199213887.003.0005>
- McKnight, D. M., Howes, B. L., Taylor, C. D., & Goehringer, D. D. (2000). Phytoplankton dynamics in a stably stratified winter lakes during winter darkness. *Journal of Phycology*, 36(5), 852–861.
- Morgan-Kiss, R. M., Ivanov, A. G., Modla, S., Czymmek, K., Hüner, N. P. A., Priscu, J. C., Lisle J. T. & Hanson, T. E. (2008). Identity and physiology of a new psychrophilic eukaryotic green alga, *Chlorella* sp., strain BI, isolated from a transitory pond near Bratina Island, Antarctica. *Extremophiles*, 12(5), 701–711. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0176-4>
- Morgan-Kiss, R. M., Ivanov, A. G., Pocock, T., Krol, M., Gudynaite-Savitch, L., & Huner, N. P. A. (2005). The Antarctic psychrophile, *Chlamydomonas raudensis* Ettl (UWO241) (Chlorophyceae, Chlorophyta), exhibits a limited capacity to photoacclimate to red light. *Journal of Phycology*, 41(4), 791–800. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00094.x>
- Müller, T., Bleiß, W., Martin, C. D., Rogaschewski, S., & Fuhr, G. (1998). Snow algae from northwest Svalbard: Their identification, distribution, pigment and nutrient content. *Polar Biology*, 20(1), 14–32. <https://doi.org/10.1007/s0030000050272>
- Nedbalová, L., & Komárek, J. (2007). Green cryosestic algae. In *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments* (pp. 321–342). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6112-7>
- Nedbalová, L., Mihál, M., Kviderová, J., Procházková, L., Řezanka, T., & Elster, J. (2017). Identity, ecology and ecophysiology of planktic green algae dominating in ice-covered

- lakes on James Ross Island (northeastern Antarctic Peninsula). *Extremophiles*, 21(1), 187–200. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0894-y>
- Nedbalová, L., Nývlt, D., Kopáček, J., Šobr, M., & Elster, J. (2013). Freshwater lakes of Ulu Peninsula, James Ross Island, north-east Antarctic Peninsula: Origin, geomorphology and physical and chemical limnology. *Antarctic Science*, 25(3), 358–372. <https://doi.org/10.1017/S0954102012000934>
- Neustupa, J., Eliáš, M., Škaloud, P., Němcová, Y., & Šejnohová, L. (2011). *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga. *Phycologia*, 50(1), 57–66. <https://doi.org/10.2216/08-64.1>
- Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., & Tominaga, N. (2003). Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*, 44(2), 253–259. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00049-7)
- Novis, P. M., Aislabie, J., Turner, S., & McLeod, M. (2015). Chlorophyta, Xanthophyceae and Cyanobacteria in Wright Valley, Antarctica. *Antarctic Science*, 27(5), 439–454. <https://doi.org/10.1017/S0954102015000164>
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., German Grehov O. G., Kandro D., Rasputin K., Syabro M. & Tleukenov, T. (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Pavlova, O. A., Pokrovsky, O. S., Manasypov, R. M., Shirokova, L. S., & Vorobyev, S. N. (2016). Seasonal dynamics of phytoplankton in acidic and humic environment in thaw ponds of discontinuous permafrost zone. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 52, 47–60. <https://doi.org/10.1051/limn/2016006>
- Peck, L. S., Clark, M. S., Clarke, A., Cockell, C. S., Convey, P., Detrich, H. W., Fraser K. P. P., Johnston I. A., Methe B. A., Murray A. E., Römisch K. & Rogers, A. D. (2005). Genomics: Applications to Antarctic ecosystems. *Polar Biology*, 28(5), 351–365. <https://doi.org/10.1007/s00300-004-0671-8>
- Pichrtová, M., Hájek, T., & Elster, J. (2014). Osmotic stress and recovery in field populations of *Zygnema* sp. (Zygnematophyceae, Streptophyta) on Svalbard (High Arctic) subjected to natural desiccation. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(2), 270–280. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12288>
- Pichrtová, M., Hájek, T., & Elster, J. (2016). Annual development of mat-forming conjugating green algae *Zygnema* spp. in hydro-terrestrial habitats in the Arctic. *Polar Biology*, 39(9), 1653–1662. <https://doi.org/10.1007/s00300-016-1889-y>
- Pienitz, R., Doran, P. T., & Lamoureux, S. F. (2008). Origin and geomorphology of lakes in the polar regions. In *Polar Lakes and Rivers: Limnology of Arctic and Antarctic Aquatic Ecosystems* (pp. 25–42). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199213887.003.0002>
- Procházková, L., Remias, D., Řezanka, T., & Nedbalová, L. (2018). *Chloromonas nivalis* subsp. tatrae, subsp. nov. (Chlamydomonadales, Chlorophyta): re-examination of a snow alga from the High Tatra Mountains (Slovakia). *Fottea*, 18(1), 1–18. <https://doi.org/10.5507/fot.2017.010>

- Remias, D., Holzinger, A., Aigner, S., & Lütz, C. (2012). Ecophysiology and ultrastructure of *Ancylonema nordenskiöldii* (Zygnematales, Streptophyta), causing brown ice on glaciers in Svalbard (high arctic). *Polar Biology*, 35(6), 899–908. <https://doi.org/10.1007/s00300-011-1135-6>
- Remias, D., Holzinger, A., & Luetz, C. (2009). Physiology, ultrastructure and habitat of the ice alga *Mesotaenium berggrenii* (Zygnemaphyceae, Chlorophyta) from glaciers in the European Alps. *Phycologia*, 48(4), 302–312. <https://doi.org/10.2216/08-13.1>
- Remias, D., Pichrtová, M., Pangratz, M., Lütz, C., & Holzinger, A. (2016). Ecophysiology, secondary pigments and ultrastructure of *Chlainomonas* sp. (Chlorophyta) from the European Alps compared with *Chlamydomonas nivalis* forming red snow. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4), fiw030. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw030>
- Remias, D., Wastian, H., Lütz, C., & Leya, T. (2013). Insights into the biology and phylogeny of *Chloromonas polyptera* (Chlorophyta), an alga causing orange snow in Maritime Antarctica. *Antarctic Science*, 25(5), 648–656. <https://doi.org/10.1017/S0954102013000060>
- Richter, D., Matuła, J., Urbaniak, J., Waleron, M., & Czerwik-Marcinkowska, J. (2017). Molecular, morphological and ultrastructural characteristics of *Prasiola crispa* (Lightfoot) Kützing (Chlorophyta) from Spitsbergen (Arctic). *Polar Biology*, 40(2), 379–397. <https://doi.org/10.1007/s00300-016-1966-2>
- Rippin, M., Borchhardt, N., Williams, L., Colesie, C., Jung, P., Büdel, B., Karsten U. & Becker, B. (2018). Genus richness of microalgae and Cyanobacteria in biological soil crusts from Svalbard and Livingston Island: morphological versus molecular approaches. *Polar Biology*, 41(5), 909–923. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2252-2>
- Rippin, M., Lange, S., Sausen, N., & Becker, B. (2018). Biodiversity of biological soil crusts from the Polar Regions revealed by metabarcoding. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(fiy036), 1–15. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy036/4919722>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Säwström, C., Mumford, P., Marshall, W., Hodson, a, & Laybourn-Parry, J. (2002). The microbial communities and primary productivity of cryoconite holes in an Arctic glacier (Svalbard 79 degrees N). *Polar Biology*, 25(8), 591–596. <https://doi.org/10.1007/s00300-002-0388-5>
- Sciuto, K., Lewis, L. A., Verleyen, E., Moro, I., & La Rocca, N. (2015). *Chodatodesmus australis* sp. nov. (Scenedesmaceae, Chlorophyta) from Antarctica, with the emended description of the genus *Chodatodesmus*, and circumscription of *Flechtneria rotunda* gen. et sp. nov. *Journal of Phycology*, 51(6), 1172–1188. <https://doi.org/10.1111/jpy.12355>
- Segawa, T., Matsuzaki, R., Takeuchi, N., Akiyoshi, A., Navarro, F., Sugiyama, S., Yonezawa M. & Mori, H. (2018). Bipolar dispersal of red-snow algae. *Nature Communications*, 9(1), 3094. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05521-w>
- Sheath, R. G., & Müller, K. M. (1997). Distribution of stream macroalgae in four High Arctic drainage basins. *Arctic*, 50(4), 355–364.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing

- technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 21(8), 1794–1805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x>
- Smith, L. C., Sheng, Y., MacDonald, G. M., & Hinzman, L. D. (2005). Atmospheric Science: Disappearing Arctic lakes. *Science*, 308(5727), 1429. <https://doi.org/10.1126/science.1108142>
- Stibal, M., Elster, J., Šabacká, M., & Kaštovská, K. (2007). Seasonal and diel changes in photosynthetic activity of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyceae) from Svalbard determined by pulse amplitude modulation fluorometry. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(2), 265–273. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00264.x>
- Stibal, M., Šabacká, M., & Kaštovská, K. (2006). Microbial communities on glacier surfaces in Svalbard: Impact of physical and chemical properties on abundance and structure of cyanobacteria and algae. *Microbial Ecology*, 52(4), 644–654. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9083-3>
- Subhadra, B., & Grinson-George. (2011). Algal biorefinery-based industry: An approach to address fuel and food insecurity for a carbon-smart world. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(1), 2–13. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4207>
- Škaloud, P., Nedbalová, L., Elster, J., & Komárek, J. (2013). A curious occurrence of *Hazenian broadyi* spec. nova in Antarctica and the review of the genus *Hazenian* (Ulotrichales, Chlorophyceae). *Polar Biology*, 36(9), 1281–1291. <https://doi.org/10.1007/s00300-013-1347-z>
- Turner, J., Colwell, S. R., Marshall, G. J., Lachlan-Cope, T. A., Carleton, A. M., Jones, P. D., Lagun V., Reid P. A. & Iagovkina, S. (2005). Antarctic climate change during the last 50 years. *International Journal of Climatology*, 25(3), 279–294. <https://doi.org/10.1002/joc.1130>
- van Iterson, G., den Dooren de Jong, L. E., & Kluyver, A. J. (1983). *Martinus Willem Beijerinck: His Life and His Work*. Science Tech. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(84\)90228-7](https://doi.org/10.1016/0968-0004(84)90228-7)
- Vincent, W. F. (1988). Microbial ecosystems of Antarctica. *Studies in Polar Research*. Cambridge University Press. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90080-3](https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90080-3)
- Vincent, W. F., & Laybourn-Parry, J. (2008). *Polar Lakes and Rivers: Limnology of Arctic and Antarctic Aquatic Ecosystems*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199213887.001.0001>
- Vyverman, W., Verleyen, E., Wilmotte, A., Hodgson, D. A., Willems, A., Peeters, K., Van de Vijver B., De Wever A., Leliaert F. & Sabbe, K. (2010). Evidence for widespread endemism among Antarctic micro-organisms. *Polar Science*, 4(2), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2010.03.006>
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088–5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- Xiao, X., Sogge, H., Lagesen, K., Tooming-Klunderud, A., Jakobsen, K. S., & Rohrlack, T. (2014). Use of high throughput sequencing and light microscopy show contrasting results in a study of phytoplankton occurrence in a freshwater environment. *PLoS ONE* 9(8): e106510. doi:10.1371/journal.pone.0106510

Internetové zdroje:

Futuyma, D. J. (1998). *Evolutionary biology*. Sinauer Associates. Retrieved from https://books.google.cz/books/about/Evolutionary_Biology.html?id=yGhdGQAACAAJ&redir_esc=y

Iconfinder [online]. Retrieved August 15, 2018, from <https://www.iconfinder.com/>

Nebesářová, J. (2001). Elektronová mikroskopie pro biology. Retrieved August 14, 2018, from <http://triton.paru.cas.cz/old-lem/book/index.html>